

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

08/423517

PCT/BR 99/00014
ESU

BR99/14



REC'D 29 JUL 1999

WIPO PCT

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, DO COMÉRCIO E DO TURISMO

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIOPIDADE

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção
regularmente depositado no Instituto Na-
cional da Propriedade Industrial, sob o
número PI 9804283-1 de 18/03/98

Rio de Janeiro, em 06 de Maio de 1999.

Assinatura manuscrita de Maria Margarida R. Mittelbach.
Maria Margarida R. Mittelbach
Diretora de Patentes



INPI-017

19804283

Protocolo 001839
18 MAR 1992

Número (21)

DEPÓSITO DE PATENTES (Uso exclusivo do INPI)

| | | | | |
|---|--|----------|---|---|
| DEPÓSITO Pedido de Patente ou de Certificado de Adição | PI9804283-1 | depósito | / | / |
| | Espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito) | | | |

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1/2

1. Depositante (71):

1.1 Nome: FUNDACAO OSWALDO CRUZ-FIOCRUZ

Qualificação:

1.3 CGC/CPF:

1.4 Endereço completo: AV. BRASIL 4365, MANGUINHOS - RIO DE JANEIRO - RJ

1.5 Telefone:

FAX:

☐ continua em folha anexa

2. Natureza:

☒ 2.1 Invenção ☐ 2.1.1 Certificado de Adição ☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: PATENTE DE INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

Processo para a produção de vírus em cultura de células e processo para a produção de vacina contra infecções causadas por Flavivirus

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do pedido nº.

, de / /

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:

Nº de depósito

Data de Depósito / /

(66)

6. Prioridade - O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

| País ou organização de origem | Número do depósito | Data do depósito |
|-------------------------------|--------------------|------------------|
| | | / / |
| | | / / |
| | | / / |

☐ continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**

() Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: MARCOS DA SILVA FREIRE

7.2 Qualificação:

7.3 Endereço: R. Cândido Portinari s/n, Condomínio Jardim Ubá, Rua 1, Q. 2
Lote 14, Pendotiba - Niterói - Brasil

7.4 CEP: 24320-000

7.5 Telefone

☒ continua em folha anexa

8. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

☐ em anexo

9. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial** (Período de graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do ato Normativo nº 127/97)

☐ em anexo

Procurador (74):

10.1 Nome e CPF/CGC: FRANCO, BHERING, BARBOSA E NOVAES

39.121.512/0001-41

10.2 Endereço AV. RIO BRANCO, 103 - 12º ANDAR RIO DE JANEIRO RJ

10.3 CEP: 20040-004

10.4 Telefone 021 221-3757

11. **Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

| | | | |
|---|--------|---|---------|
| <input checked="" type="checkbox"/> 11.1 Guia de recolhimento | 1 fls. | <input checked="" type="checkbox"/> 11.5 Relatório descritivo | 47 fls. |
| <input checked="" type="checkbox"/> 11.2 Procuração | 0 fls. | <input checked="" type="checkbox"/> 11.6 Reivindicações | 10 fls. |
| <input checked="" type="checkbox"/> 11.3 Documentos de prioridade | 0 fls. | <input checked="" type="checkbox"/> 11.7 Desenhos | 11 fls. |
| <input checked="" type="checkbox"/> 11.4 Doc. de contrato de trabalho | 0 fls. | <input checked="" type="checkbox"/> 11.8 Resumo | 3 fls. |
| 11.9 Outros (especificar): | | | 0 fls. |
| 11.10 Total de folhas anexadas: | | | 72 fls. |

12. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

RIO DE JANEIRO 18/03/1998

Local e Data

FRANCO, BHERING, BARBOSA E NOVAES
39.121.512/0001-41

Assinatura e Carimbo

Nome: ANNA MAYA YOSHIDA YAMAMURA

Qualificação:

Endereço: R. Paul Gauguin, Quadra 5, Lote 7, Condomínio Green Country Pendotiba Niterói BRASIL

Cep:

Telefone:

Nome: GEORGE FOBES MANN

Qualificação:

Endereço: Av. Brasil 4365, BioManguinhos Manguinhos Rio de Janeiro BRASIL

Cep: 21045-900

Telefone:

Nome: RICARDO GALLER

Qualificação:

Endereço: R. Cândido Portinari s/n, Condomínio Jardim Ubá, Rua 2, Q. 3, Lote 15 Pendotiba Niterói, Brasil

Cep: 24320-000

Telefone:

u
e/

**PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE VÍRUS EM CULTURA DE CÉLULAS
E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE VACINA CONTRA INFECÇÕES
CAUSADAS POR FLAVIVIRUS**

A presente invenção se refere à produção de vírus
5 em cultura de células com elevado rendimento,
particularmente para a produção de Flavivirus em
cultura de células fibroblastos, e mais particularmente
para a produção de qualquer sub-linhagem 17D do vírus
da febre amarela em cultura de fibroblastos de embrião
10 de galinha. O vírus, presente em preparação de vacina,
pode ser obtido por inativação ou atenuação do vírus ou
por modificação genética através da tecnologia de DNA
recombinante.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 As vacinas convencionais normalmente são
preparadas pela produção de grandes quantidades de
vírus em cultura de tecido celular ou em animais de
laboratório, tornando o vírus inócuo sem, no entanto,
destruir suas propriedades imunológicas.
20 Tradicionalmente, isso é conseguido tanto pela
inativação da infecciosidade do vírus ou pela seleção
de um vírus não-virulento ou atenuado para uso em
vacinas vivas. A atenuação é frequentemente conseguida
pela adaptação do vírus a condições de crescimento que
25 não são usualmente empregadas (ou seja, diferentes
animais hospedeiros ou culturas de células) e por
frequentes passagens de quantidade significativa de

inóculo viral em cultura de células com a finalidade de selecionar mutantes que não sejam virulentos e, assim, produzam sintomas mínimos ou até mesmo nenhum sintoma clínico.

5 Na passagem seriada em cultura de células, vírus vacinais atenuados têm a capacidade de, por mutação ou seleção, reverter ao fenótipo virulento. Assim, é prática comum usar o sistema de lote semente, no qual o vírus original, uma vez mostrado ter a atenuação com
10 relação à infecção humana, é passado uma única vez para o preparo de um lote semente primário (principal). Uma ou mais alíquotas de vírus dessa semente primária são passadas uma vez mais para fornecer uma preparação de semente secundária (semente de trabalho). Uma ou mais
15 alíquotas dessa preparação de semente secundária são usadas na produção de um lote de vacina. Dessa forma, a passagem seriada pode ser limitada e, assim, a probabilidade de ocorrência de seleção ou mutação pode ser minimizada. Um exemplo desse método de obtenção de
20 vírus vacinais atenuados é a produção de linhagens vacinais de vírus da Febre Amarela.

Na figura 1A, é representada a história de passagem do vírus da Febre Amarela desde a linhagem original Asibi da Febre Amarela (YF Asibi) bem como a
25 derivação das linhagem vacinal 17D da Febre Amarela (YF 17D) e algumas de suas sub-linhagens. A linhagem Asibi do vírus da Febre Amarela foi subcultivado em tecido

embrionário de camundongo e em tecido embrionário total de galinha, com ou sem tecido nervoso. Essas passagens produziram as linhagens parental: 17D, na passagem 180; 17DD, na passagem 195 e 17D-204, na passagem 204. A
5 linhagem 17DD foi posteriormente subcultivada até a passagem 241 e submetida a 43 passagens adicionais em ovos de galinha embrionados, sendo a preparação final de vacina correspondente à vacina produzida atualmente e usada para vacinação humana. A linhagem 17D-204 foi
10 posteriormente subcultivada para produzir a linhagem Colombia 88 a qual, após passagem em ovos de galinha embrionado, deu origem a diferentes lotes semente de vacina, atualmente em uso na França (Instituto Pasteur, na passagem 235) e nos Estados Unidos (Connaught, na
15 passagem 234). A linhagem 17D-213 foi derivada da 17D-204, o que aconteceu em consequência do uso do lote semente primário (S1 112-69), originário da Alemanha (FRG (Republica Federal da Alemanha) 83-66), pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para produzir uma
20 semente 17D (S1 213/77), na passagem 237, livre de vírus causadores da leucose aviária.

Novas sub-linhagens 17D foram desenvolvidas através do uso da tecnologia do DNA recombinante, as quais requereram um melhor conhecimento da estrutura
25 genômica e expressão dos flavivirus. O vírus da Febre Amarela é o vírus protótipo para o gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* de vírus RNA de fita positiva. Os

Flavivirus têm a forma esférica com 40-60 nm de diâmetro e com capsídeo icosaédrico contendo uma molécula de RNA de fita única positiva, sendo que a replicação viral acontece inteiramente no citoplasma celular. O RNA genômico do vírus da Febre Amarela
5 consiste de 10.862 nucleotídeos com estreitas regiões não-traduzidas 5' (118 nucleotídeos) e 3' (511 nucleotídeos). Esse único RNA é também o mensageiro viral e sua tradução na célula infectada resulta na síntese de uma poliproteína precursora que, após
10 clivagens proteolíticas pós-traducionais gera 10 polipeptídeos vírus-específicos. O estudo pioneiro de Rocaniello e Baltimore (Rocaniello, V.R. and Baltimore, D. (1981). "Cloned poliovirus complementary DNA is
15 infectious in mammalian cells". Science. 214: 916-919) mostrou, pela primeira vez, a possibilidade de se gerar vírus a partir do cDNA clonado. Com o desenvolvimento dos sistemas de transcrição *in vitro* (ver Melton, D.A.; Krieg, P.A.; Rabagliati, M.R.; Maniatis, T.; Zinn, K.
20 and Green, M.R. (1984). "Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter". Nucl. Acids. Res. 12: 7035-7056) tornou-se possível sintetizar, *in vitro*, o RNA viral completo com uma
25 eficiência muito maior do que a da transcrição do cDNA na célula. O desenvolvimento de metodologias mais eficientes de transcrição na célula, tais como

lipossomas e eletroporação ajudou a melhorar a eficiência de transfecção de células em cultura com RNA. Já está estabelecida a metodologia básica para realizar o que hoje é conhecido como a tecnologia de clone infeccioso. Para um bom número de vírus de fita positiva, o cDNA infeccioso já está disponível e pode ser usado para se entender a base molecular de diversos fenômenos biológicos, incluindo a atenuação. Em 1989 (Rice et al, 1989), foi desenvolvido, pela primeira vez, o cDNA completo do vírus da Febre Amarela, dando origem ao vírus amarílico, após a transfecção com RNA sintetizado *in vitro* de células de vertebrados em cultura.

A Figura 1B mostra a derivação da progênie dos vírus a partir do clone infeccioso da Febre Amarela. O RNA viral das sub-linhagens 17D mencionadas na Figura 1A, denominadas F-204, C-204, 17D-213 e vacina 17DD foram objeto de determinação da sequência nucleotídica completa por diversos grupos de pesquisadores que já publicaram trabalhos a respeito. Cada uma das sub-linhagens 17D-204, F-204 e C-204 foi submetida a purificação em placa em diferentes linhagens de células, sendo o vírus obtido dessa purificação amplificado em células SW13 para análise de clonagem e sequenciamento com o cDNA. Para os vírus 17D-213 e 17DD, o RNA foi extraído do vírus que havia sido purificado a partir de preparação vacinal e, assim,

pode-se dizer, com mais segurança, que essas populações representam a sequência que confere ao vírus vacinal o fenótipo atenuado. O primeiro cDNA derivado do vírus da Febre Amarela originou-se da biblioteca de cDNA da linhagem C-204 (Rice, C.M.; Grakoui, A.; 5 Galler, R. and Chambers, T. (1989). "Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by *in vitro* ligation". The New Biologist. 1: 285-296), mas a caracterização do vírus recuperado desse cDNA, após transfecção em células CEF 10 (YFiv5.2/SL na passagem 241) e uma passagem em ovos embrionados utilizando a metodologia de produção de vacina de Febre Amarela (Yfiv 5.2/VL na passagem 242), revelou um vírus com grau inaceitável de 15 neurovirulência em primatas não-humanos e, desse modo, não apropriado para testes em vacinação humana (Marchevsky, R.S., Mariano, J., Ferreira, V.S., Almeida, E., Cerqueira, M.J., Carvalho, R., Pissurno, J.W., Travassos da Rosa, A.P.A., Simões, M.C., Santos, 20 C.N.D., Ferreira, I.I., Muylaert, I.R., Mann, G.F., Rice, C.M. and Galler, R., "Phenotypic analysis of yellow fever virus derived from complementary", DNA Am. J. Trop. Med. Hyg., 52(1), pp. 75-80, 1995). A comparação das sequências nucleotídicas das sub- 25 linhagens 17D-213 e 17DD, mostradas na figura 1A, levou à necessidade da modificação genética do cDNA do vírus C-204 para torná-lo mais semelhante ao vírus 17DD.

Este novo cDNA foi usado para se obter a síntese *in vitro* do RNA que, após transfecção em células CEF, deu origem ao novo vírus semente denominado Yfiv 5.2/DD na passagem 241. Este vírus foi então usado para preparar os lotes semente primário e secundário, ambos em CEF, nas passagens 242 e 243, respectivamente, como descrito no Pedido de Patente Brasileiro PI 9701774, depositado em nome do mesmo titular do presente pedido. Em suma, dado as bem conhecidas propriedades vacinais do vírus 17D da Febre Amarela com respeito à segurança e eficácia, a capacidade de manipular o seu genoma abriu caminho para o seu desenvolvimento como vetor para a expressão de antígenos de outros patógenos.

Independentemente do vírus vacinal ser obtido por inativação, atenuação ou pelo uso de tecnologia do DNA recombinante, o vírus precisa ser compatível com a célula hospedeira, isto é, ser capaz de replicação autônoma na célula hospedeira. Mais do que isso, na produção em larga-escala, a célula hospedeira precisa ter características tais que o vírus possa crescer nela com rendimento elevado. Células para a produção de vacinas de vírus "vivo" para uso parenteral em humanos são limitadas àquelas que estão livres de agentes fortuitos, que sejam não-tumorgênicas e cariotipicamente normais. Tais células incluem culturas primárias ou culturas de passagens seriadas derivadas de uma grande variedade de tecidos de aves ou

mamíferos, tais como fibroblastos diplóides humanos (por exemplo, MRC-5), rim de macaco (MK), fibroblastos de embrião de aves (por exemplo, fibroblastos de embrião de galinha) e muitos outros. Essas células são infectadas com o vírus ("vírus semente") que então replica na célula e é usualmente liberado no meio de cultura. As condições e materiais usados no processo completo precisam ser cuidadosamente monitoradas para evitar problemas relacionados principalmente com a variabilidade genética, perda de imunogenicidade, inativação do vírus, neurovirulência, baixo rendimento com relação ao vírus inicial e contaminação por agentes estranhos ao processo.

Nos documentos US 5,391,491 e US 5,550,051 foi proposto um método de produção de vírus/antígeno viral, em particular ao flavivirus denominado vírus da encefalite causada por carrapato, por infecção de uma biomassa consistindo de agregados de células de embrião de aves tendo diâmetros entre 100 μm e 1,000 μm com o dito vírus em um meio de cultura tendo uma concentração de oxigênio de pelo menos 0,01 mmol/l, o agregado de células estando presente em uma concentração de pelo menos 10 mg de agregados de células por ml. O depositante mencionou que o controle do tamanho dos agregados e da concentração de oxigênio visa tanto a redução da contaminação provocada pelas proteínas celulares contidas no meio, originadas da gradual lise

celular, como o aumento da reprodutibilidade do vírus/antígeno viral que pode ser baixo quando células individuais ou agregados pequenos estão presentes na suspensão. É também mencionado, com base em medidas
5 efetuadas, que foi demonstrado que a produção de vírus/antígeno viral será fortemente reduzida, em uma produção de maior escala, em uma cultura tendo uma densidade celular de 2×10^7 células por ml, cultura essa que se comunica com o oxigênio atmosférico
10 exclusivamente através da superfície.

Diversas tentativas têm sido feitas para preservar a imunogenicidade do vírus vacinal. No documento US 5,021,347 é descrito um vírus vaccinia recombinante o qual expressa a proteína do vírus da Encefalite
15 Japonesa visando evitar a redução das propriedades imunogênicas do vírus vacinal. A cultura de células animais usadas na infecção com o vírus pode ser qualquer célula na qual o vírus vaccinia possa crescer. Os exemplos específicos de cultura de células citados
20 na patente incluem TK-143 (derivada de osteosarcoma humano), FL (derivada de amniom humano), Hela (derivada de carcinoma de colo de útero humano), KB (derivada de carcinoma rino-faríngeo humano), CV-1 (derivada de rim de macaco), BSC-1 (derivada de rim de
25 macaco), RK13 (derivada de rim de coelho), L929 (derivada de tecido conjuntivo de camundongo), célula CE (embrião de galinha), células CEF (fibroblastos de

embrião de galinha).

Adicionalmente, é informado, em Marchevsky et al (Marchevsky et al, 1995), que culturas primárias de fibroblastos de embrião de galinha (CEF), produzidas a
5 partir de ovos livres de patógenos específicos (SPF), certificados para a produção de vacina humana, são apropriados para a preparação de lotes semente originais de um vírus vacinal recombinante de Febre Amarela.

10 Apesar das vantagens no uso de células certificadas SPF-CEF para produzir vírus vacinais, tais como sarampo, cachumba, rubéola, é verificado frequentemente que o processo torna-se relativamente anti-econômico devido a baixos rendimentos. Isso é
15 particularmente verdadeiro para o vírus vacinal da Febre Amarela produzida em CEF nas densidades celulares normalmente usadas (1×10^6 células/cm²) nas quais o rendimento é diretamente proporcional à concentração inicial do vírus. Assim, a quantidade e custos do vírus
20 semente necessário sob essas condições é excessivamente elevado devido à necessidade da realização de testes caros de neurovirulência em cada lote semente.

As condições ótimas de produção de vírus precisam ser cuidadosamente controladas em termos de temperatura
25 e tempo de incubação, densidade celular e inóculo de vírus. Adicionalmente, um número razoável de outros fatores determinam o rendimento viral. Assim, alguns

vírus facilmente geram partículas defectivas de interferência que são evitadas pelo uso de baixas concentrações virais no inóculo. Alguns vírus são bons indutores de interferon e podem ser sensíveis à sua
5 ação. A estabilidade no meio de cultura que está sendo utilizado é também um fator de vital importância pois o rendimento é estabelecido pelo equilíbrio entre a produção e a perda de infectividade.

10 O papel do interferon no sistema vírus/células tem sido estudado desde a descoberta do interferon por Isaacs e Lindemann (Isaacs, A. e Lindemann, J. Proc. Roy. Soc. Ser. B., 147: 258. 1957). Os interferons são substâncias que possuem propriedades anti-virais. Eles são produzidos por certos tipos de células que tenham
15 sido estimuladas por exposição ao vírus, a certos ácidos nucléicos ou a complexos antígenos/mitógenos.

Os interferons de aves e de mamíferos podem ser classificados em três categorias principais, alfa, beta e gama. O interferon alfa é produzido por leucócitos, o
20 beta por fibroblastos e o gama por linfócitos KT naturais estimuladas por antígenos, tumores e mitógenos. Os três são secretados pelas respectivas células após serem estimuladas por vírus ou outro indutor. Os interferons são frequentemente
25 referenciados à célula que lhes dá origem e, assim, o interferon gama é também conhecido como "imuno" interferon. A atividade do interferon é

tradicionalmente determinada com base na sua capacidade de induzir resistência em células quando estas são desafiadas por um vírus sensível a interferon. Na produção de vírus vacinais em cultura de células, o sistema de interferon é responsável por baixo rendimento viral de alguns vírus vacinais, pois eles podem ser bons indutores de interferon e/ou sensíveis à sua ação. O vírus vacinal 17D de Febre Amarela é tanto um bom indutor de interferon como é extremamente sensível à sua ação.

Na verdade, a atividade do interferon é a capacidade das células resistirem à infecção causada por vírus. Desse modo, os interferons são drogas potencialmente potentes que se mostram promissores como agentes clínicos anti-virais.

Se, por um lado, a atividade anti-viral dos interferons é uma vantagem com relação ao tratamento de seres humanos contra doenças causadas por vírus, por outro, ela é uma desvantagem quando se trata da produção *in vitro* de vírus devido à inibição destes pelos interferons, especificamente, na replicação de vírus em células. Essa é provavelmente a principal causa dos baixos rendimentos na produção de muitos vírus vacinais.

Tanto isso é verdade que o documento de patente FR 2 689 519 propõe um processo de cultura *in vitro* de células infectadas com um vírus associado à esclerose

no qual a cultura primária de células é infectada com o vírus em um meio de cultura que contém anticorpos policlonais anti-interferon-beta para inibir a atividade anti-viral do interferon-beta. A desvantagem
5 desse processo é a adição de anticorpos contaminantes que podem ser difíceis de separar do produto desejado, limitando, assim, sua utilidade na produção de vírus vacinal.

Portanto, fica demonstrada a grande necessidade de
10 um processo aperfeiçoado para produzir vírus vacinais indutores e sensíveis ao interferon sem as desvantagens acima mencionadas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

O objetivo da invenção é um processo para a
15 produção de vírus em cultura de células com rendimento elevado e baixos níveis de contaminação por proteínas celulares, sendo o vírus apropriado para uso na preparação de lotes semente e vacinas. Como aqui usado, o termo "vírus" significa vírus inativado, vírus
20 atenuado ou vírus recombinante, incluindo vírus quimérico. Em particular, o vírus quimérico pode ter um genoma que compreende sequências de ácido nucléico codificantes de pelo menos uma proteína estrutural de um flavivirus e sequências de ácido nucléico
25 codificantes do restante do genoma de outro flavivirus que o torne funcional. Mais particularmente, o vírus quimérico pode ter um genoma que compreende sequências

de ácido nucléico codificantes de pelo menos uma proteína estrutural de um flavivirus e sequências de ácido nucléico codificantes do restante do genoma do vírus 17D da Febre Amarela que o torne funcional.

5 Em uma primeira concretização, a presente invenção se refere a um processo que compreende as etapas de:

10 (a) preparação de uma cultura de células que são permissivas ao vírus e aceitáveis como um substrato na produção de vacina; (b) suspensão das células em um meio apropriado seguida da semeadura de células a

15 baixas densidades; (c) incubação da cultura de células a 30 até 40°C por um período de tempo apropriado; (d) remoção do meio de cultura de células da etapa (c) e inoculação com vírus semente; (e) incubação da cultura

20 de células da etapa (d) a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado; (f) remoção do meio seguido de lavagem das células uma ou mais vezes para reposição do meio; (g) incubação da cultura de células obtidas na

25 etapa (f) a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado; (h) coleta parcial ou completa do sobrenadante de cultura contendo o vírus, com ou sem

 adição de estabilizador; (i) opcionalmente, realização de coletas múltiplas de meio contendo o vírus, a intervalos desejados, pela reposição do meio removido e

 re-incubação da cultura por um período de tempo apropriado; (j) opcionalmente, remoção dos restos celulares e das células íntegras do vírus coletado; (l)

opcionalmente, inativação do vírus e; (m) armazenagem do vírus a -45°C ou temperaturas mais baixas.

Em outra concretização, a presente invenção se refere a um processo de produção de vacina de
5 Flavivirus em cultura de células, compreendendo as etapas de: (a) preparação de uma cultura de células que são permissivas ao vírus e aceitáveis como um substrato na produção de vacina; (b) suspensão das células em um meio apropriado seguida da semeadura de células a
10 baixas densidades; (c) incubação da cultura de células a 30 até 40°C por um período de tempo apropriado; (d) remoção do meio da cultura de células da etapa (c) e inoculação com vírus semente; (e) incubação da cultura de células da etapa (d) a 25 até 40°C por um período de
15 tempo apropriado; (f) remoção do meio seguido de lavagem das células uma ou mais vezes para reposição do meio; (g) incubação da cultura de células obtidas na etapa (f) a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado; (h) coleta parcial ou completa do
20 sobrenadante de cultura contendo o vírus, com ou sem adição de estabilizador; (i) opcionalmente, realização de coletas múltiplas de meio contendo o vírus, a intervalos desejados, pela reposição do meio removido e re-incubação da cultura por um período de tempo
25 apropriado; (j) opcionalmente, remoção dos restos celulares e das células integras do vírus coletado; (l) opcionalmente, inativação do vírus e; (m)

opcionalmente, liofilização da composição de vacina das etapas h, i, j ou l para obter a forma liofilizada da composição de vacina. Se for usado estabilizador, ele pode ser adicionado ao vírus coletado nas etapas em que
5 haja troca de meio antes da estocagem a -45 até -196°C. O produto de vacina apropriadamente não contém níveis significativos de proteínas da célula hospedeira, por exemplo, proteínas de galinha (< 100 nanogramas/dose humana).

10 A presente invenção representa um grande avanço na produção de lotes semente e de vírus vacinais e é caracterizada por um controle preciso das condições de processo e das matérias primas, tais como densidade e tipo de células a serem infectadas pelo vírus,
15 quantidade de inóculo viral e uso de estabilizadores.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIGURA 1 ilustra a passagem histórica da linhagem original Asibi do vírus da Febre Amarela e a derivação da linhagem vacinal 17D do vírus da Febre Amarela e
20 suas sub-linhagens (A); e a progênie de vírus do clone infeccioso do vírus da Febre Amarela (B).

FIGURA 2 ilustra o rendimento da linhagem 17D do vírus da Febre Amarela com relação ao tempo de incubação (A); ao nível de interferon induzido com
25 relação ao tempo de incubação (B) e o grau de resistência ao desafio com o vírus Sindbis com relação ao tempo de incubação (C).

FIGURA 3 mostra a inibição mediada por interferon do vírus Sindbis em culturas de células de fibroblastos de embrião de galinha infectadas com o vírus da Febre Amarela, linhagem YF 17D. As culturas foram infectadas com diluições seriais de vírus da Febre Amarela e incubadas a 37°C. Após 5 horas (A), 24 horas (B) e 72 horas © as culturas foram submetidas à ação do vírus Sindbis.

FIGURA 4 mostra a influência do pré-tratamento das células com Actinomicina D: referente ao interferon induzido com o tempo de incubação (A) e referente ao rendimento de vírus da Febre Amarela, linhagem 17D, com o tempo de incubação.

FIGURA 5 mostra diagramaticamente a estrutura do protótipo do genoma do Flavivirus e a estrutura dos vírus quiméricos obtidos pelo uso da metodologia da presente invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Diversos fatores podem influenciar o rendimento de vírus. O elevado grau de pureza requerido para vacinas que são administradas ao homem limita os métodos alternativos que podem ser aplicados para elevar o rendimento do vírus obtido.

No Simpósio Internacional de Febre Amarela e Dengue ("International Symposium on Yellow Fever and Dengue - Fifty years from the introduction of the 17D strain in Brazil", Rio de Janeiro, Brasil, Maio 15-19,

1988), foi discutida a necessidade de se aperfeiçoar o processo de produção do vírus vacinal da Febre Amarela. Lopes, O.S. (Lopes, O.S, "Development of a Yellow Fever vaccine in tissue culture". In International Symposium
5 on Yellow Fever and Dengue - Fifty years from the introduction of the 17D strain in Brazil Annals) introduziu o uso de cultura de células CEF na produção do vírus vacinal 17D da Febre Amarela. O incentivo para se usar cultura de células ao invés de embrião de
10 galinha, foi o de solucionar diversos problemas importantes relacionados ao elevado conteúdo de proteínas de ovo na vacina (até 250 µg de proteína de galinha por dose humana) e dificuldades relacionadas com a expansão da produção em larga escala.

15 Apesar de Lopes, O.S. ter citado o uso de células CEF como uma potencial solução dos problemas acima mencionados, um aspecto muito importante de produção permaneceu sem solução, especificamente o baixo rendimento de vírus produzido com relação à quantidade
20 de vírus semente usada. Essa é uma das razões pelas quais as vacinas de Febre Amarela ainda continuam a ser produzidas pela inoculação viral de embrião de galinha nos ovos.

Assim, estudos da replicação do vírus 17D de Febre
25 Amarela em CEF foram realizados com o objetivo de se conhecer os fatores que causam a redução no rendimento do vírus. Os fatores investigados foram: a presença de

partículas defectivas interferentes (DI), a indução de interferon, a sensibilidade do vírus à ação do interferon e o efeito das taxas de semeadura das células. As Tabelas I e II e figuras 2 e 3 mostram os resultados de experiências usando o vírus 17D-213 da Febre Amarela em CEF. Essa sub-linhagem da linhagem 17D do vírus da Febre Amarela foi usada por ser o vírus semente da OMS (Organização Mundial de Saúde) e conhecida por ser livre de complexo de vírus da leucose aviária e devido a estarem bem caracterizados o seu fenótipo atenuado e imunogenicidade tanto em primatas não-humanos como em humanos. Além disso ela foi recomendada pela Organização Mundial de Saúde para ser empregada no estabelecimento da produção de vacina 17D da Febre Amarela em cultura de células e, consequentemente, foi o vírus usado por Lopes, O.S. nos estudos iniciais na produção de vacina de Febre Amarela em células CEF as quais produziram vírus atenuado para primatas não-humanos em três lotes consecutivos de produção. Sua história de passagem é mostrada na Figura 1A. Células Vero foram usadas como controles (Tabela 1D) pois essas células são conhecidas por fornecer múltiplos ciclos de replicação, efeito citopático completo e não serem produtores de interferon.

TABELA I: REPLICAÇÃO DE VÍRUS 17D EM CULTURA DE CÉLULAS CEF CONFLUENTES E DE CÉLULAS VERO

| LOG ₁₀ DA DILUIÇÃO DO VÍRUS SEMENTE | TEMPO DE INCUBAÇÃO PÓS-INOCULAÇÃO | | | | | | pfu/célula Dia 2 Arit. |
|--|-----------------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|------------------------------|
| | 5 HORAS | 1 DIA | 2 DIAS | 3 DIAS | 5 DIAS | 7 DIAS | |
| A. RENDIMENTO DE VÍRUS EM CEF (Log ₁₀ pfu/ml) | | | | | | | |
| - 1.0 | 2,36 | 5,11 | 5,27 | 4,32 | < 1,76 | < 1,76 | 0,093 |
| - 2.0 | < 1,76 | 3,96 | 4,67 | 3,36 | < 1,76 | < 1,76 | 0,023 |
| - 3.0 | < 1,76 | 3,40 | 4,46 | (2,36) | < 1,76 | < 1,76 | 0,014 |
| - 4.0 | < 1,76 | 2,06 | 4,00 | (2,61) | < 1,76 | < 1,76 | 0,005 |
| - 5.0 | < 1,76 | 1,76 | 2,96 | (2,46) | < 1,76 | < 1,76 | < 0 |
| | n = | 5 | 5 | | | | |
| ANÁLISE POR | r = | - 0,985 | - 0,968 | | | | |
| REGRESSÃO LINEAR | p = | < 0,01 | < 0,01 | | | | |
| | k = | - 0,860 | - 0,529 | | | | |
| B. RENDIMENTO DE INTERFERON EM CEF (Log ₁₀ Unidades/ml) | | | | | | | |
| - 1.0 | < 1,30 | 1,60 | 3,17 | 3,15 | 2,64 | 2,88 | |
| - 2.0 | < 1,30 | < 1,30 | 2,83 | 2,57 | 2,11 | 2,18 | |
| - 3.0 | < 1,30 | < 1,30 | 2,18 | 1,78 | 1,70 | 1,48 | |
| - 4.0 | < 1,30 | < 1,30 | < 1,30 | 1,48 | 1,48 | 1,48 | |
| - 5.0 | < 1,30 | < 1,30 | < 1,30 | (1,48) | 1,30 | < 1,30 | |
| | n = | | | 4 | | | |
| ANÁLISE POR | r = | | | - 0,987 | | | |
| REGRESSÃO LINEAR | p = | | | < 0,02 | | | |
| | k = | | | - 0,580 | | | |
| C. RESISTÊNCIA DE CEF AO VÍRUS SINDBIS (% REDUÇÃO DE PLACA) | | | | | | | |
| - 1.0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| - 2.0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| - 3.0 | 0 | 30* | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| - 4.0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | |
| - 5.0 | 0 | 0 | 13* | 100 | 100 | 100 | |

(CONTINUAÇÃO DA TABELA I)

D. RENDIMENTO DE VÍRUS EM CÉLULAS VERO (Log₁₀ Unidades/ml)

| LOG ₁₀ DA DILUIÇÃO DO VÍRUS SEMENTE | TEMPO DE INCUBAÇÃO PÓS-INOCULAÇÃO | | | | | | pfu/célula maior valor Arit. |
|---|-----------------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|------------------------------------|
| | 5 HORAS | 1 DIA | 2 DIAS | 3 DIAS | 5 DIAS | 7 DIAS | |
| - 1.0 | 2,51 | 3,77 | 5,80 | 7,28 | 6,17 | < 1,76 | 19,05 |
| - 2.0 | < 1,76 | 3,01 | 4,74 | 7,19 | 6,40 | < 1,76 | 15,49 |
| - 3.0 | < 1,76 | (1,76) | 4,11 | 6,66 | 6,59 | < 1,76 | 4,57 |
| - 4.0 | < 1,76 | (1,76) | 3,10 | 5,01 | 7,30 | < 1,76 | 19,95 |
| - 5.0 | < 1,76 | < 1,76 | 2,06 | 4,26 | 7,64 | 4,71 | 43,65 |
| <hr/> | | | | | | | |
| | n = | 5 | 5 | 5 | | | |
| ANÁLISE POR | r = | - 0,997 | - 0,951 | + 0,974 | | | |
| REGRESSÃO LINEAR | p = | < 0,001 | < 0,1 | < 0,05 | | | |
| | k = | - 0,912 | - 0,822 | + 0,384 | | | |

OBS:

(1) * TAMANHO REDUZIDO DE PLACA

(2) CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS:

CEF → Inicial 2 x 10⁶/ml, Final 1 x 10⁶/ml-
controles

(3) MOI (MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO)

VERO → Inicial 1 x 10⁶/ml, Final 2.2 x 10⁶/ml-
controlesCEF → 0,025 pfu/célula a 10^{-1.0}

Como mostrado na Tabela IA e Figura 2A, as células CEF forneceram os maiores valores de rendimento do vírus 17D após 2 dias de incubação, estando os \log_{10} dos rendimentos linearmente relacionados com o logaritmo da concentração inicial de vírus ($r = 0,968$, $p < 0,01$). Cada dez vezes de redução da concentração inicial de vírus resultou em um decréscimo de 0,53 log no rendimento de vírus. Não foram observados efeitos citopatogênicos durante o período de 7 dias de incubação.

Como esperado, as células Vero apresentaram, com relação ao tempo de incubação, rendimentos semelhantes para todas as concentrações iniciais de vírus, estando o título máximo inversamente relacionado com o \log_{10} da concentração do inóculo do vírus (Tabela 1D). No terceiro dia, por exemplo, o rendimento está diretamente relacionado com a concentração inicial de vírus ($r = + 0,951$, $p < 0,1$) enquanto que para o quinto dia, essa relação fica invertida ($r = - 0,974$, $p < 0,05$). Os rendimentos de vírus em células Vero foram cerca de 200 vezes maiores do que aqueles obtidos em CEF, mesmo nas mais baixas concentrações iniciais de vírus. Um efeito cito-patogênico quase total foi observado em todas as culturas de células Vero infectadas.

Os rendimentos de vírus em ambos os tipos de células não mostraram reduções significativas mesmo em elevadas concentrações iniciais de vírus. Em múltiplos

ensaios de vírus em células Vero, usando elevadas concentrações de vírus, foi sempre observado efeito citopático, ou seja, não tivesse ocorrido "destruição" celular. Rendimento reduzido e "destruição" celular em elevadas concentrações virais iniciais representam os indicadores básicos da existência de partículas defectivas interferentes (DI(s)). Dessa forma, esses resultados constituem prova definitiva de que as DI(s) não desempenham papel significativo na replicação dos vírus 17D.

No entanto, como mencionado acima, foi verificado que o sistema interferon é um dos principais mecanismos que limitam a replicação do vírus 17D da Febre Amarela pois este, tanto é um bom indutor de interferon como é sensível à sua ação.

Na mesma experiência descrita acima, o interferon foi induzido a alguns níveis (Tabela IB, Figura 2B) em todas as culturas de CEF infectadas, sendo constatado que os rendimentos estão diretamente relacionados à concentração inicial de vírus ($r = 0.987$, $p < 0.02$). Foi, ainda, demonstrado que todas as culturas de CEF infectadas com vírus 17D da Febre Amarela e que foram, posteriormente, durante períodos de tempo variados de pós-infecção, submetidas à ação de vírus Sindbis (um vírus de conhecida sensibilidade ao interferon) (Tabela 1C, Figuras 2C e 3) mostraram-se totalmente resistentes à infecção no terceiro dia e resistentes no segundo dia

exceto para concentrações iniciais de vírus mais baixas. Tal constatação levou à conclusão de que a indução de interferon e a sensibilidade à sua ação são os principais fatores que influenciam o rendimento do vírus 17D em CEF.

Todas as sub-linhagens testadas do vírus 17D da Febre Amarela (DD, 5.2/VL e 5.2/DD) mostraram um comportamento semelhante ao do vírus 17D-213 (discutido acima) no que se refere à indução de interferon e à sensibilidade.

Esses resultados demonstram a necessidade de se infectar as células com o vírus sob condições de processo específicas para escapar da ação do sistema interferon. De acordo com esse raciocínio, o uso de substâncias inibidoras de interferon seria uma possível solução para aumentar o rendimento de vírus. No entanto, ditas substâncias ou são fracas inibidoras de interferon ou podem ser tóxicas para as células e não são aceitáveis por serem contaminantes em vacinas. Em relação a isto, estudos recentes mostraram que a actinomicina D, um conhecido inibidor irreversível da síntese de DNA dependente de RNA, bloqueia a resposta de interferon, permitindo múltiplos ciclos de replicação e maiores rendimentos de vírus da Febre Amarela. A Figura 4 mostra a influência do pré-tratamento das células com actinomicina D e subsequente infecção com o vírus 17D da Febre Amarela. Este

procedimento permitiu um aumento substancial no rendimento de vírus quando comparado às culturas controle. Este resultado, que pode ser atribuído à inibição da produção de interferon, confirma a tese de
5 que o sistema interferon é responsável pelos baixos rendimentos. No entanto, a actinomicina D é relativamente tóxica para as células e, dessa forma, não é aceitável como contaminante em vacinas.

Com base em todas essas constatações, o último
10 aspecto investigado para evitar a indução do sistema interferon foi estudar a influência da densidade celular no momento da infecção viral.

Os resultados de uma experiência típica para
testar o efeito da densidade de semeadura celular no
15 rendimento do vírus 17DD da Febre Amarela com CEF estão apresentados na Tabela II.

TABELA II: INFLUÊNCIA DA DENSIDADE DE SEMEADURA CELULAR NO RENDIMENTO DE VÍRUS 17D DA FEBRE AMARELA EM CEF

| Células/cm ² x 10 ⁴ | Células/ml x 10 ⁵ | Log ₁₀ pfu/ml | Rendimento pfu/célula | |
|--|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| | | | Log ₁₀ | Arit. |
| 1 | 0,25 | (7,11) | 2,71 | 513 |
| 3 | 0,75 | 7,28 | 2,40 | 251 |
| 5 | 1,25 | 6,78 | 1,68 | 47,9 |
| 7 | 1,75 | 6,30 | 1,06 | 11,5 |
| 9 | 2,25 | 6,15 | 0,80 | 6,3 |
| 20 | 5,00 | 5,48 | - 0,22 | 0,6 |

| | | |
|---|--|---|
| ANÁLISE POR | | n = 5 (valores entre parentesis foram excluídos) |
| REGRESSÃO LINEARS | | r = 0,993 (p < 0,001) |
| (log ₁₀ células/cm ² versus log ₁₀ pfu/ml) | | k = 2,197 (aumento do log ₁₀ rendimento para uma redução de 1 log nas células) |

Esses resultados demonstram inequivocamente que o log₁₀ do rendimento de vírus está inversa e linearmente relacionada com o log₁₀ da concentração (r = 0,994, p < 0,001) de células semeadas na faixa de 3 x 10⁴ a 2 x 10⁵ células/cm². Nessa faixa, é obtido um aumento de 2,2 log₁₀ no rendimento do vírus/ml para cada log₁₀ de decréscimo na concentração de células. A 3 x 10⁴ células/cm², a densidade na qual é obtido o rendimento máximo por mililitro, o rendimento por célula foi de 251 pfu/célula ou 418 vezes mais que aquela obtida a 2 x 10⁵ células/cm². Esses resultados provam definitivamente que o rendimento de vírus infeccioso/ml e o rendimento/célula está inversamente relacionado com

a densidade de semeadura celular. Desse modo, a ação do sistema de interferon pode ser evitada e, conseqüentemente, pode ser estabelecida uma eficiente produção.

5 Em elevadas densidades de semeadura de células não foi observada citopatologia, enquanto que a baixas densidades foi observada a morte de todas as células no prazo de cerca de 1 dia após os rendimentos de vírus terem alcançado seu valor máximo. Em densidades
10 intermediárias, foi observada citopatologia parcial.

De acordo com a invenção, um dos maiores avanços conseguidos na produção de vírus vacinal foi o de executar a semeadura de células com o vírus em baixas densidades de células, isto é, em densidades de
15 semeadura de células mais baixas que 2×10^5 células/cm², preferencialmente em densidades na faixa de $1 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ células/cm² e mais preferencialmente $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ células/cm².

Outro aspecto relevante na produção de vírus
20 vacinal está relacionado com as substâncias usados no meio de cultura, pois proteínas outras que não as virais não são aceitáveis como componentes de vacinas humanas. Por exemplo, proteínas do soro fetal bovino não são aceitáveis em produtos parenterais devido à sua
25 imunogenicidade. Por outro lado, testes têm demonstrado que são obtidos mais baixos rendimentos de vírus em culturas de células, por exemplo CEF, na ausência de

soro fetal bovino (FBS). Em estudos experimentais foi constatado que os rendimentos de vírus 17D de Febre Amarela foram reduzidos em cerca de 100 vezes na ausência de soro.

- 5 A Tabela III mostra a replicação de vírus da Febre Amarela (sub-linhagem 17DD) e a resistência induzida pela ação do vírus Sindbis na presença e ausência de soro.

TABELA III: REPLICAÇÃO DO VÍRUS 17D DA FEBRE AMARELA E RESISTÊNCIA INDUZIDA PELA AÇÃO DO VÍRUS SINDBIS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SORO

| Log ₁₀ da diluição do vírus semente | % de resistência ao vírus Sindbis após 48 horas | |
|--|---|---------|
| | Com FBS | Sem FBS |
| 1 | 100 | 100 |
| 2 | 100 | 100 |
| 3 | 90 | 90 |
| 4 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 |
| Controles | 0 | 0 |

Os resultados demonstram claramente que o vírus replica bem na ausência de soro e que nenhuma mudança significativa ocorre na indução de interferon. Na verdade, os baixos rendimentos de vírus de Febre Amarela em CEF na ausência de FBS pode ser atribuída ao efeito estabilizador de vírus produzido pela fração de albumina contida no FBS.

Dessa forma, de acordo com a invenção, suplementos de meio aceitáveis como componentes em produtos parenterais, por exemplo albumina de soro humano (HSA), são usados em culturas de células para estabilizar o vírus com o objetivo de se obter elevados rendimentos. Outras substâncias aceitáveis como componentes em produtos parenterais podem ser usados., tais como peptídeos, amino ácidos, proteínas,

De acordo com a invenção, a cultura de células a

ser infectada pelo vírus pode ser qualquer uma na qual o vírus possa replicar e que seja aceitável como substrato para a produção de vacinas, em particular qualquer tipo de célula que produza interferon, na qual
5 flavivirus ou recombinantes possam crescer e, para a qual o mesmo procedimento de redução da densidade celular possa ser aplicado. Exemplos específicos incluem células de embrião de aves e células de mamíferos, tais como, fibroblastos de embrião de galinha (CEF), células de embrião de galinha (CE),
10 fibroblastos diplóides humanos (por exemplo, MRC-5), células de rim de macaco, células fetais de pulmão de Rhesus (FRhL), etc.

A invenção é particularmente apropriada para a
15 produção de Flavivirus e produção de Flavivirus recombinante.

De acordo com a invenção, vírus recombinante da Febre Amarela, como definido no Pedido de Patente Brasileiro PI 9701774, pode ser produzido em uma
20 biomassa consistindo de células certificadas de fibroblastos de embrião de aves, em particular células de fibroblastos de embrião de galinha SPF (livre de patógeno específico). O Pedido de Patente Brasileiro PI 9701774 é aqui citado apenas como referência.

25 O processo para produção de vacina 17D de Febre Amarela aqui descrito foi estabelecido com base no uso de diversas sub-linhagens de vírus 17D.

Consequentemente, é um procedimento para a propagação de vírus 17D em geral, seja ele um vírus 17D derivado de passagem posterior de quaisquer sub-linhagens 17D já existentes ou sejam vírus recombinantes derivados de
5 cDNA complementar clonado através da tecnologia do clone infeccioso.

Outros vírus recombinantes 17D de Febre Amarela podem incluir:

1) vírus quimérico, para uso em preparação de vacina após propagação usando a metodologia da presente invenção, tendo um genoma que compreende sequências de ácidos nucleicos codificante de pelo menos uma proteína estrutural de um flavivirus (representado pelas áreas claras na Figura 5) e sequências de ácidos nucleicos
15 codificantes do restante do genoma do vírus 17D da Febre Amarela para torná-lo funcional (representado pelas áreas escuras na Figura 5). A fonte de sequências do vírus 17D da Febre Amarela pode ser os plasmídeos pYF5'3'IV/G1/2 and pYFM5.2/T3/27 ou quaisquer outros
20 plasmídeos que contenham as sequências genômicas do vírus 17D da Febre Amarela.

O esquema da Figura 5 mostra, no topo, a estrutura do protótipo do genoma do flavivirus. A partir da extremidade 5', a ordem das proteínas codificadas é a
25 seguinte: C-prM/M; E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. As 3 primeiras proteínas constituem as proteínas estruturais, isto é, formam o vírus juntamente com a

molécula de RNA encapsulada e foram denominadas de capsídeo (C, 12-14kDa), membrana (M, e seu precursor prM, 18-22 kDa) e envelope (E, 52-54 kDa), todas sendo codificadas no primeiro quarto do genoma. O restante

5 do genoma codifica as proteínas não-estruturais (NS) numeradas na ordem em que ocorre a síntese de 1 a 5. Três grandes proteínas não-estruturais possuem sequências altamente conservadas dentre os flavivirus, NS1 (38-41 kDa), NS3 (68-70 kDa) e NS5 (100-103 kDa).

10 Até hoje, ainda não foi determinado qual seria o papel desempenhado pela NS1, mas a NS3 tem mostrado ser bifuncional com uma atividade de protease necessária ao processamento da poliproteína nos sítios em que as proteases celulares não atuam e uma atividade

15 nucleotídica da trifosfatase/helicase estando, portanto, também associada à replicação do RNA viral. NS5, a maior e mais conservada das proteínas, contém diversos padrões de sequência que acredita-se ser comum às polimerases do RNA viral. As 4 proteínas menores

20 NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são pouco conservadas em suas sequências de amino ácidos mas não no seu padrão de múltiplas ligações hidrofóbicas. Tem sido verificado que a proteína NS2A é necessária para o processamento apropriado da proteína NS1 e, NS2B estando associada

25 com a atividade proteolítica da NS3 e com a produção da NS4B. Na medida em que a síntese do RNA ocorre no citosol em associação com membranas RER ("Rough

Endoplasmic Reticulum") tem sido afirmado que essas proteínas hidrofóbicas estariam inseridas nas membranas e, dessa forma, as interações proteína-proteína participam nos complexos da replicação viral juntamente com NS3 e NS5. As curtas regiões não-traduzidas (118 nucleotídeos) e 3' (511 nucleotídeos) contêm elementos de sequência nucleotídica, alguns dos quais são conservados dentre os flavivirus e, acredita-se, estarem envolvidos na replicação da fita positiva e negativa do RNA e do encapsulamento da fita positiva do RNA. Flavivirus quiméricos podem incluir o capsídeo C até a proteína envelope E, prM-E ou E somente, de um dos flavivirus e o restante derivado de um segundo flavivirus como indicado nas duas partes inferiores da Figura 5. A fusão entre as proteínas C e prM de quaisquer dois flavivirus, incluindo o da Febre Amarela, pode ser feita através da extremidade carboxi de C (seus últimos 20 amino ácidos), no sítio de clivagem da protease viral ou no sítio de clivagem da signalase. Adjacente ao primeiro nucleotídeo do genoma viral, na forma de cDNA clonado em plasmídeo bacteriano, encontra-se uma sequência do promotor polimerase do fago bacteriano (SP6, T7 ou T3) que permite a eficiente síntese *in vitro* dos transcritos infecciosos. Esses, por sua vez, originam o vírus após a transfecção do RNA em cultura de células.

2) vírus 17D da Febre Amarela expressando epítomos

definidos, domínios de proteínas ou proteínas inteiras de outros patógenos relacionados a aspectos específicos da resposta humoral ou imuno-celular que possa ser usada como vacina contra dita doença inseridos nos genes das proteínas estruturais e não-estruturais ou nas regiões não codificantes do genoma do vírus 17D da Febre Amarela.

3) vírus 17D da Febre Amarela expressando, a partir de epítomos definidos do RNA sub-genômico, domínios de proteínas ou proteínas inteiras de outros patógenos relacionados a aspectos específicos da resposta humoral ou imuno-celular que possa ser usada como vacina contra dita doença.

Em todos os casos acima (1-3), o vírus recombinante ainda contém a maior parte se não todo o genoma do vírus 17D da Febre Amarela e, consequentemente, todas as etapas principais para a replicação viral na célula hospedeira serão as mesmas que aquelas para o vírus original 17D. Isso inclui replicação citoplásmica, a participação das proteínas virais do 17D da Febre Amarela na síntese do RNA viral (fita positiva e negativa), processamento da poliproteína, formação do capsídeo com o encapsulamento do RNA, montagem e saída do vírus da célula. Na medida em que todos os aspectos principais que levam a uma infecção produtiva são mantidos, independentemente da extensão da modificação genética em todos os casos

especificados acima a metodologia da invenção será aplicada.

Dessa maneira, de acordo com uma das concretizações da presente invenção, o vírus vacinal da
5 Febre Amarela é produzido segundo normas de alta qualidade ("Good Manufacturing Practices" - GMP), por infecção de células certificadas para a produção de vacina humana e recuperação do vírus.

10 Em uma das concretizações preferidas da invenção, a propagação do vírus é feita em células certificadas para a produção de vacinas humanas, sendo que culturas primárias de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) usadas em todas as etapas de produção. Células com essas características estão disponíveis e são
15 preparadas de acordo com as instruções da Organização Mundial da Saúde (WHO (World Health Organization Guidelines)), como descrito em diversos Procedimentos Operacionais Padrão (POPs). Particularmente no caso do vírus da Febre Amarela, a produção da vacina 17D da
20 Febre Amarela em culturas de CEF, forneceu 3 lotes de vacina experimental que passou em todos os testes incluindo os de neurovirulência em macacos.

O vírus é preparado em culturas primárias de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) usando ovos
25 derivados de granjas livres de patógeno específico (SPF, "Specific Pathogen Free"). As culturas de células de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) podem ser

preparadas em diferentes formas, por exemplo, monocamadas; em suspensão, em um bioreactor apropriado; adsorvida em microcarreadores. A preparação de células CEF é bem conhecida dos especialistas na técnica. As
5 culturas de células são fixadas em um meio apropriado e são, mais tarde, infectadas. Os vírus, após incubação, são recuperados por centrifugação ou filtração para a remoção dos restos celulares. Ao sobrenadante contendo o vírus é adicionado um estabilizador, o qual, sabem os
10 especialistas na técnica, melhora a estabilidade da infecciosidade viral durante o congelamento, descongelamento e manipulações subsequentes. Os vírus são armazenados a -45°C ou a temperaturas mais baixas.

Os exemplos a seguir são ilustrativos da invenção
15 e representam concretizações preferidas. Os especialistas na técnica têm o conhecimento suficiente, ou são capazes através de experiências rotineiras, para empregar outros materiais e técnicas apropriados, tais como as células acima mencionadas e os métodos de
20 produção de vírus.

EXEMPLO 1

A finalidade deste exemplo é obter-se Flavivírus, em particular o vírus 17D da Febre Amarela, em culturas de células de fibroblastos de embrião de galinha (CEF)
25 dispostas em monocamadas, como a seguir:

(1) tecido embrionário de galinha SPF é convertido em uma suspensão de células por tratamento enzimático (Dia

0). Esta preparação é bem conhecida dos especialistas na técnica;

(2) as células são recuperadas e suspensas em um meio apropriado seguido de semeadura em recipientes
5 (frascos, reator/propagador de multisuperfície, etc) contendo a monocamada de cultura a 0,1 até 1,2 ml/cm² para fornecer 10⁷ até 10⁸ células/cm²;

(3) a cultura é incubada por 12 a 72 horas em temperatura de 30 a 40 °C;

10 (4) o meio é removido das monocamadas e o vírus é adicionado em um pequeno volume de meio apropriado a uma taxa de 0,2 - 0,0001 unidades infecciosas por célula (CCID₅₀, LD₅₀, pfu);

(5) o vírus é adsorvido por 0.5 a 4 horas a temperatura
15 de 20 a 40°C (Dia 1);

(6) um meio de manutenção apropriado é adicionado a 0,1 a 1,0 ml/cm² com ou sem a remoção da preparação semente e re-incubação a 30 - 40°C por 15 a 30 horas;

(7) o meio de manutenção é removido e as monocamadas
20 são lavadas uma ou mais vezes e substituído com meio de manutenção livre de soro;

(8) as monocamadas são re-incubadas a 30 - 40°C (Dia 2). Após um tempo de incubação apropriado (por exemplo, 36 a 72 horas após a inoculação, a 37° C), o meio de
25 manutenção contendo o vírus é colhido (Dia 3) e;

(9) o vírus é armazenado a -45 a -196°C.

Múltiplas coletas, em intervalo de tempo desejado,

do meio contendo o vírus podem ser feitas por remoção parcial ou completa do meio.

EXEMPLO 2

A finalidade deste exemplo é demonstrar o efeito
5 estabilizante da albumina sobre o vírus.

O processo foi executado da mesma maneira que
aquela do exemplo 1 no qual é incorporada albumina de
soro humano ao meio de manutenção a 0,01 a 10 µg/ml nas
etapas 6, 7 e 9. As Tabelas IV e V mostram os
0 resultados.

TABELA IV: ESTABILIDADE DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA EM MEIO CONTENDO CONCENTRAÇÕES VARIADAS DE ALBUMINA DE SORO HUMANO

| Concentração de albumina % w/v | Log ₁₀ pfu/ml Horas a 37°C | | | | Meia-vida | |
|--------------------------------------|--|------|-------|-------|------------|-------|
| | 0.25 | 1.08 | 2.37 | 3.50 | Perda/hora | Horas |
| 0.500 | TNC* | TNC* | 2.51 | 2.31 | 0.18 | 1.7 |
| 0.250 | TNC* | TNC* | 2.51 | 2.40 | 0.10 | 3.0 |
| 0.125 | TNC* | TNC* | 2.55 | 2.33 | 0.19 | 1.6 |
| 0.063 | TNC* | TNC* | 2.48 | 2.33 | 0.13 | 2.3 |
| 0.031 | TNC* | TNC* | 2.50 | 2.00 | 0.27 | 1.11 |
| 0.000 | TNC* | 1.00 | <0.40 | <0.40 | <1.80 | <0.40 |

* - Muito numeroso para contar ("Too Numbered to Count").

Esses resultados são aproximações mas pode-se perceber uma forte indicação de que 0,03125% w/v HSA é insuficiente para proteger a infectividade do vírus. A taxa média de perda na presença de 0,0625 a 0,2500% w/v de albumina é 0,15 log₁₀/hora equivalente a uma meia-vida de 2 horas.

TABELA V: INFLUÊNCIA DA ALBUMINA DE SORO HUMANO (HSA) E TEMPO DE COLETA NO RENDIMENTO DO VÍRUS 17D DE FEBRE AMARELA EM CEF.

| HSA % w/v | Horas de pós- inoculação | Log ₁₀ pfu/ml | pfu/ml Aritmético |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|
| 0.06 | 29 | 4.83 | 0.6 |
| | 44 | 6.71 | 85.1 |
| | 48 | 6.82 | 109.6 |
| | 53 | 6.69 | 81.3 |
| | 68 | 6.04 | 18.2 |
| 0.20 | 29 | 5.00 | 1.7 |
| | 44 | 6.70 | 83.2 |
| | 48 | 6.95 | 147.9 |
| | 53 | 6.85 | 117.5 |
| | 68 | 6.23 | 28.2 |

Como mostrado na Tabela V, os títulos mais elevados foram observados a 48 horas na presença de 0,06 e 0,2% w/v. O rendimento por célula é altamente satisfatório, ou seja, valores na faixa de 100 pfu/célula. Assim, fica demonstrado que o HSA, que é um componente de vacina totalmente aceitável, fornece excelentes rendimentos de vírus. Esses valores certamente devem ser maiores pois as amostras estão diluídas à metade (0.3 log₁₀) no estabilizador, tendo os ensaios sido realizados em um sistema que é 0,2 a 0,3 log₁₀ menos sensível do que aquele usado para o vírus controle que é o produto final produzido pelo método tradicional, ou seja com o uso de embrião total de

galinha. Com base nesses dados, a correção dos títulos apresentados nas Tabelas IV e V dá valores log: p_fu_ml da ordem de cerca de 7.0, os quais são iguais àqueles obtidos na produção de vacina com o embrião completo de galinha.

EXEMPLO 3

O propósito deste exemplo é ilustrar a produção de Flavivirus, em particular de vírus 17D da Febre Amarela, produzido segundo normas de alta qualidade ("Good Manufacturing Practices" - GMP) por infecção de células certificadas para a preparação de vacina humana:

Um total de 21 garrafas de cultura rotativa com uma área superficial de 680 cm² cada foram usadas para cada lote. As instruções da Organização Mundial da Saúde (WHO (World Health Organization) Guidelines) estabelecem que 10% dos frascos ou um volume mínimo de 500 ml de cultura seja usado como controle. Para esta finalidade, a cada lote, foram separados 7 frascos de área superficial de 175 cm² cada um com culturas estacionárias.

A preparação de cada lote foi realizada seguindo o mesmo procedimento do Exemplo 1.

Células primárias CEF obtidas de ovos derivados de granja SPF (Specific Pathogen Free) foram usados em todos os lotes. O vírus semente 17DD-LOT 102/84 foi usado para inocular todas as culturas de células.

Os vírus foram recuperados pela transferência do meio presente em 3 garrafas de cultura rotativa para 1 frasco de centrifuga seguido de centrifugação a baixa velocidade para remover os restos celulares. O sobrenadante foi aspirado para dentro de frascos contendo estabilizador na proporção de 1:1 seguindo-se congelamento por rotação em banho de gelo seco contendo etanol após a remoção de todas as aliquotas para o controle de qualidade. Todos os vírus são estocados como indicado no Exemplo 1.

Os dados de produção são apresentados na Tabela VI abaixo.

TABELA VI: DADOS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINA DE FEBRE AMARELA PRODUZIDA EM FIBROBLASTOS DE EMBRIÃO DE GALINHA (CEF) DE ACORDO COM AS GMP

| Lote | Data de produção | Título (\log_{10} pfu/ml) |
|--------------|------------------|------------------------------|
| YFCEF-LOT 01 | 02/02/98 | 6.79 |
| YFCEF-LOT 02 | 03/02/98 | 6.68 |
| YFCEF-LOT 03 | 04/02/98 | 6.66 |
| YFCEF-LOT 04 | 05/02/98 | 6.75 |

Cada lote foi testado quanto à esterilidade, potência e presença de agentes adventícios, tendo sido obtidos resultados satisfatórios.

EXEMPLO 4

A finalidade deste exemplo é a de descrever a

preparação de vírus recombinante da Febre Amarela, incluindo vírus quiméricos usando o processo da presente invenção:

O vírus 17D da Febre Amarela do Pedido de Patente Brasileiro PI 9701774 foi regenerado a partir dos plasmídeos pYF5'3'IV/G1/2 e pYFM5.2/T3/27 e serão aqui referenciados como YFiv5.2/DD. O depósito dos plasmídeos pYF5'3'IV/G1/2 e pYFM5.2/T3/27 foi feito junto à American Type Culture Collection, estando os mesmos identificados pelos números de acesso ATCC No. 97771 e No. 97772, respectivamente.

a) Transfecção do RNA:

A transfecção das células CEF é feita com LipofectAMINE[™] (Life Technologies catalogue # 18324-012). Esse produto é uma formulação lipossômica 3:1 (p/p) de lipídio policationico (2,3-dioleiloxi-N-[2(sperminocarboxiamido)etil]-N-N,dimetil-2,3-bis(9-octadeceniloxi)-1-propanaminium trifluoro acetato) e a etanolamina dioleoilfosfatidil (DOPE) neutra em água filtrada em membrana) a uma concentração de 20 µg/ml em PBS livre-de-RNase. PBS - tampão fosfato salino- é preparado e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. A LipofectAMINE[™] é pipetada em um tubo de poliestireno de 5 ml contendo PBS. Células primárias CEF são semeadas e usadas 24 horas após a semeadura.

A mistura de transcrição é gotejada sobre a monocamada de cultura de células. As células são

incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura é removida por aspiração, lavada com PBS e incubada por 72 horas no meio 199.

O sobrenadante da cultura constitui o estoque viral após a adição de estabilizador. O estoque viral é testado quanto à esterilidade, toxicidade, potência e quanto à presença de agentes adventícios. O estoque viral é o lote semente original.

A infecciosidade específica dos transcritos é determinada a partir de ensaios nos quais as diluições seriadas do RNA são tranfectadas em células Vero e estas são recobertas com meio semi-sólido. A coloração com cristal violeta para a contagem de placas e determinação da quantidade de RNA, utilizando a medida de densidade óptica (DO) a 260 nm, permite a determinação da infecciosidade específica dos transcritos (PFU/ μ g RNA total).

Essa determinação é relevante para estabelecer a multiplicidade de infecção que leva ao estoque original. Ela assegura um número aceitável de eventos equivalentes à infecção com o vírus vivo de maneira a reduzir a probabilidade de acumulação de mutações no genoma viral dado o elevado número de ciclos de replicação devido ao baixo fornecimento de RNA.

b) Preparação dos lotes semente:

Todos os lotes foram preparados em culturas primárias de células CEF usando ovos derivados de

granjas SPF ("Specific Pathogen Free"). Os vírus foram recuperados pela transferência do sobrenadante em cada frasco de cultura para frascos de centrifuga seguido de centrifugação a baixa velocidade para remover os restos celulares. O sobrenadante foi aspirado para dentro de frascos contendo estabilizador na proporção de 1:1 e congelamento por rotação em banho de gelo seco contendo etanol após a remoção de todas as aliquotas para o controle de qualidade. Todos os vírus foram estocados como indicado acima.

b.1) Preparação do lote semente original:

O lote semente original consiste do material proveniente de 3 ensaios separados de transcrição/transfecção realizados em dias diferentes com diferentes lotes de culturas primárias de células CEF.

CEF primárias foram semeadas. Um total de 3 frascos de cultura descartáveis de 175 cm³, contendo RNA *in vitro* transcrito foram transfectados em células CEF usando LipofectAmine⁴. Cada frasco de cultura forneceu um total de 80 ml de sobrenadante de cultura. Nas três transfecções separadas realizadas em dias diferentes e, portanto com diferentes lotes de células CEF, os títulos dos lotes semente originais foram: T1, 10⁶ (4,66 Log: pfu/ml); T2, 10⁶ (4,87 Log: pfu/ml) e T3, 10⁶ (5,46 Log: pfu/ml). Cada lote forneceu um volume total de 480 ml de vírus original. Oitenta ml foram

usados no controle de qualidade e os restantes 400 ml para a preparação do(s) lote(s) semente primário(s).

b.2) Preparação do lote semente primário:

Dois lotes semente primários foram preparados e identificados como LP1 and LP2. LP1 deriva do lote semente original T3 enquanto LP2 deriva do T2. Cada um foi testado quanto à esterilidade, potência e presença de agentes adventícios, tendo sido obtidos resultados satisfatórios.

Os volumes e títulos obtidos foram:

| Lote Semente | Volume (ml) | Título (Log ₁₀ pfu/ml) |
|--------------|----------------|--------------------------------------|
| LP1 | 1200 | 6,22 |
| LP2 | 1600 | 6,20 |

pfu = unidade formadora de placa

b.3) Lotes semente secundários:

Três lotes semente secundários foram preparados e identificados como LS1, LS2 e LS3. LS1 e LS2 derivam do lote semente primário LP1 enquanto que LS3 deriva do LP2. Cada um foi testado quanto à esterilidade, potência e presença de agentes adventícios, tendo sido obtidos resultados satisfatórios.

•

5

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de vírus em cultura de células caracterizado por compreender as etapas de:

(a) preparação de uma cultura de células que sejam
5 permissivas ao vírus e aceitáveis como substrato para a produção de vacinas;

(b) suspensão das células em um meio apropriado seguida de sementeira das células a baixas densidades;

(c) incubação da cultura de células a 30 até 40°C
0 por um período de tempo apropriado;

(d) remoção do meio da cultura de células da etapa c e inoculação com o vírus semente;

(e) incubação da cultura de células da etapa d a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado;

15 (f) remoção do meio seguida de lavagem das células uma ou mais vezes e reposição do meio;

(g) incubação da cultura de células da etapa f a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado;

20 (h) coleta parcial ou completa do sobrenadante da cultura que contém o vírus com ou sem adição de estabilizador;

(i) opcionalmente, efetuar, a qualquer intervalo de tempo desejado, múltiplas coletas de meio contendo o vírus pela reposição do meio removido e re-incubação da
25 cultura por um período de tempo apropriado;

(j) opcionalmente, remoção dos restos celulares e das células integras do vírus coletado;

(l) opcionalmente, inativação do vírus; e

(m) estocagem do vírus a -45°C ou temperaturas mais baixas.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1
5 caracterizado por serem as células selecionadas do grupo consistindo de células de embrião de aves e células de mamíferos que produzem interferon quando submetidas a infecção viral, tais como fibroblastos de embrião de galinha (CEF), células de embrião de galinha (CE), fibroblastos diplóides humanos por exemplo (MRC-5), células de rim de macaco, células fetais de pulmão de Rhesus (FRhL).

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 e 2
15 caracterizado pelo fato de que as células são primárias ou derivadas de qualquer passagem posterior das mesmas.

4. Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3
3 caracterizado por ser a semeadura das células efetuada a densidades mais baixas que 2×10^4 células/cm².

5. Processo de acordo com a reivindicação 4
20 caracterizado por ser a semeadura das células efetuada em densidades na faixa de 1×10^4 - 2×10^4 células/cm².

6. Processo de acordo com a reivindicação 5
caracterizado por ser a semeadura das células efetuada em densidades na faixa de 1×10^4 - 1×10^5 células/cm².

25 7. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por serem as culturas das etapas e, g e i incubadas por um período de tempo de 12 a 144 horas.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7 caracterizado por ser a cultura incubada por um período de tempo de 12 a 72 horas.

9. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo fato do estabilizador ser usado na etapa h.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9 caracterizado pelo fato do estabilizador ser uma substância aceitável como componente em produtos parenterais e selecionada do grupo consistindo de albumina de soro humano (HSA), peptídeos, amino ácidos ou proteínas e suas misturas.

11. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 10 caracterizado pelo fato de que o vírus é um vírus do tipo selvagem, vírus atenuado ou vírus recombinante.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato de que o vírus é um Flavivirus.

13. Processo de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelo fato do Flavivirus ser o vírus da Febre Amarela.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13 caracterizado pelo fato de que o vírus da Febre Amarela é um vírus atenuado.

15. Processo de acordo com a reivindicação 14 caracterizado pelo fato do vírus da Febre Amarela ser um vírus da linhagem 17D ou de suas sub-linhagens.

16. Processo para a produção de vírus recombinante

em cultura de células caracterizado por compreender as etapas de:

(a) preparação de uma cultura de células que sejam permissivas ao vírus e aceitáveis como um substrato na
5 produção de vacinas;

(b) semeadura das células a baixas densidades;

(c) transfecção das células com ácidos nucleicos por tratamento com lipídeos sintéticos ou eletroporação;

10 (d) incubação da cultura de células a 30 até 40°C por um período de tempo apropriado;

(e) remoção do meio da cultura de células da etapa d e inoculação com vírus semente;

15 (f) incubação da cultura de células da etapa e a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado;

(g) remoção do meio seguido de lavagem das células uma ou mais vezes e reposição do meio;

(h) incubação da cultura de células da etapa g a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado;

20 (i) coleta parcial ou completa do sobrenadante da cultura que contem o vírus com ou sem adição de estabilizador;

(j) opcionalmente, efetuar, a qualquer intervalo de tempo desejado, múltiplas coletas de meio contendo o
25 vírus pela reposição do meio removido e re-incubação da cultura por um período de tempo apropriado;

(l) opcionalmente, remoção dos restos celulares e

das células integras do vírus coletado;

(m) opcionalmente, inativação do vírus e;

(n) estocagem do vírus a -45°C ou temperaturas mais baixas.

5 17. Processo de acordo com a reivindicação 16
 caracterizado por serem as células selecionadas do
 grupo consistindo de células de embrião de aves e
 células de mamíferos que produzem interferon quando
 submetidas a infecção viral, tais como fibroblastos de
 embrião de galinha (CEF), células de embrião de galinha
 (CE), fibroblastos diplóides humanos (po exemplo. MRC-
 5), células de rim de macaco, células fetais de pulmão
 de Rhesus (FRhL).

 18. Processo de acordo com as reivindicações 16 e
15 17 caracterizado pelo fato de que as células são
 primárias ou derivadas de qualquer passagem posterior
 das mesmas.

 19. Processo de acordo com as reivindicações 16,
17 e 18 caracterizado por ser a semeadura das células
20 efetuada a densidades mais baixas que 2×10^5 células/cm².

 20. Processo de acordo com a reivindicação 19
 caracterizado por ser a semeadura das células efetuada
 em densidades na faixa de 1×10^5 - 2×10^5 células/cm².

 21. Processo de acordo com a reivindicação 22
25 caracterizado por ser a semeadura das células efetuada
 em densidades na faixa de 1×10^5 - 1×10^6 células/cm².

 22. Processo de acordo com a reivindicação 16

caracterizado pelo fato de que as culturas das etapas f, h e j são incubadas por um período de tempo de 12 a 144 horas.

23. Processo de acordo com a reivindicação 22
5 caracterizado pelo fato de que a cultura é incubada por um período de tempo de 12 a 72 horas.

24. Processo de acordo com a reivindicação 16
caracterizado pelo fato de que é usado estabilizador na etapa i.

0 25. Processo de acordo com a reivindicação 24
caracterizado pelo fato do estabilizador ser uma substância aceitável como componente em produtos parenterais e selecionada do grupo consistindo de albumina de soro humano (HSA), peptídeos, amino ácidos
15 ou proteínas e suas misturas

26. Processo de acordo com as reivindicações 16 a 25 caracterizado pelo fato de que o vírus recombinante é um Flavivirus.

20 27. Processo de acordo com a reivindicação 26
caracterizado pelo fato de que o Flavivirus recombinante é o vírus da Febre Amarela.

25 28. Processo de acordo com as reivindicações 16 a 25 caracterizado pelo fato do vírus recombinante ser um vírus quimérico tendo um genoma que compreende sequências de ácidos nucleicos codificantes de pelo menos uma proteína estrutural de um flavivirus e sequências de ácidos nucleicos codificantes do restante

do genoma de outro flavivirus para torná-lo funcional.

29. Processo de acordo com a reivindicação 28 caracterizado pelo fato de que o vírus recombinante é um vírus quimérico tendo um genoma compreendendo 5 sequências de ácidos nucleicos codificantes de pelo menos uma proteína estrutural de um flavivirus e sequências de ácidos nucleicos codificantes do restante do genoma do vírus 17D da Febre Amarela para torná-lo funcional.

30. Processo para a produção de vacina contra infecções causadas por Flavivirus em cultura de células caracterizado por compreender as etapas de:

(a) preparação de uma cultura de células que sejam permissivas ao vírus e aceitáveis como substrato para a 15 produção de vacinas;

(b) suspensão das células em um meio apropriado seguida de semeadura das células a baixas densidades;

(c) incubação da cultura de células a 30 até 40°C por um período de tempo apropriado;

20 (d) remoção do meio da cultura de células da etapa c e inoculação com o vírus semente;

(e) incubação da cultura de células da etapa d a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado;

25 (f) remoção do meio seguida de lavagem das células uma ou mais vezes e reposição do meio;

(g) incubação da cultura de células da etapa f a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado;

(h) coleta parcial ou completa do sobrenadante da cultura que contém o vírus com ou sem adição de estabilizador;

(i) opcionalmente, efetuar, a qualquer intervalo de tempo desejado, múltiplas coletas de meio contendo o vírus pela reposição do meio removido e re-incubação da cultura por um período de tempo apropriado;

(j) opcionalmente, remoção dos restos celulares e das células íntegras do vírus coletado;

(l) opcionalmente, inactivação do vírus; e

(m) opcionalmente, liofilização da composição de vacina das etapas h, i, j ou l para obter-se a composição de vacina na forma seca congelada.

31. Processo de acordo com a reivindicação 30
15 caracterizado por serem as células selecionadas do grupo consistindo de células de embrião de aves e células de mamíferos que produzem interferon quando submetidas a infecção viral, tais como fibroblastos de embrião de galinha (CEF), células de embrião de galinha
20 (CE), fibroblastos diplóides humanos (po exemplo. MRC-5), células de rim de macaco, células fetais de pulmão de Rhesus (FRhL).

32. Processo de acordo com as reivindicações 30 e
31 caracterizado pelo fato de que as células são
25 primárias ou derivadas de qualquer passagem posterior das mesmas.

33. Processo de acordo com as reivindicações 30,

31 e 32 caracterizado por ser a semeadura das células efetuada a densidades mais baixas que 2×10^4 células/cm².

34. Processo de acordo com a reivindicação 33 caracterizado por ser a sementeira das células efetuada em densidades na faixa de 1×10^4 - 1×10^6 células/cm².

35. Processo de acordo com a reivindicação 24 caracterizado pelo fato de que as culturas das etapas e, g e i são incubadas por um período de tempo de 16 to 72 horas.

0 36. Processo de acordo com a reivindicação 30
caracterizado pelo fato de ser usado estabilizador na
etapa h.

37. Processo de acordo com a reivindicação 36
caracterizado pelo fato do estabilizador ser uma
15 substância aceitável como componente em produtos
parenterais e selecionada do grupo consistindo de
albumina de soro humano (HSA), peptídeos, amino ácidos
ou proteínas e suas misturas.

38. Processo de acordo com as reivindicações 30 a 37, caracterizado pelo fato de que o vírus é um vírus do tipo selvagem, vírus atenuado ou vírus recombinante.

39. Processo de acordo com a reivindicação 38 caracterizado pelo fato de que o Flavivirus é o vírus da Febre Amarela.

25 40. Processo de acordo com as reivindicações 38 e
39 caracterizado pelo fato de que o vírus da Febre
Amarela é um vírus atenuado.

41. Processo de acordo com as reivindicações 39 e 40 caracterizado pelo fato do vírus da Febre Amarela ser um vírus da linhagem 17D ou de suas sub-linhagens.



PASSAGEM

PASSAGEM

240

C-204 cDNA



241

transfecção em CEF
YFiv5.2/SL



242

ovos embrionados
YFiv5.2/VL



cDNA do vírus
semelhante ao DD



241

transfecção em CEF
YFiv5.2/DD
T1/T2/T3



242

infecção em CEF
lotes semente primários
LP1; LP2



243

infecção em CEF
lotes semente secundários
LS1; LS2; LS3

FIGURA 1B

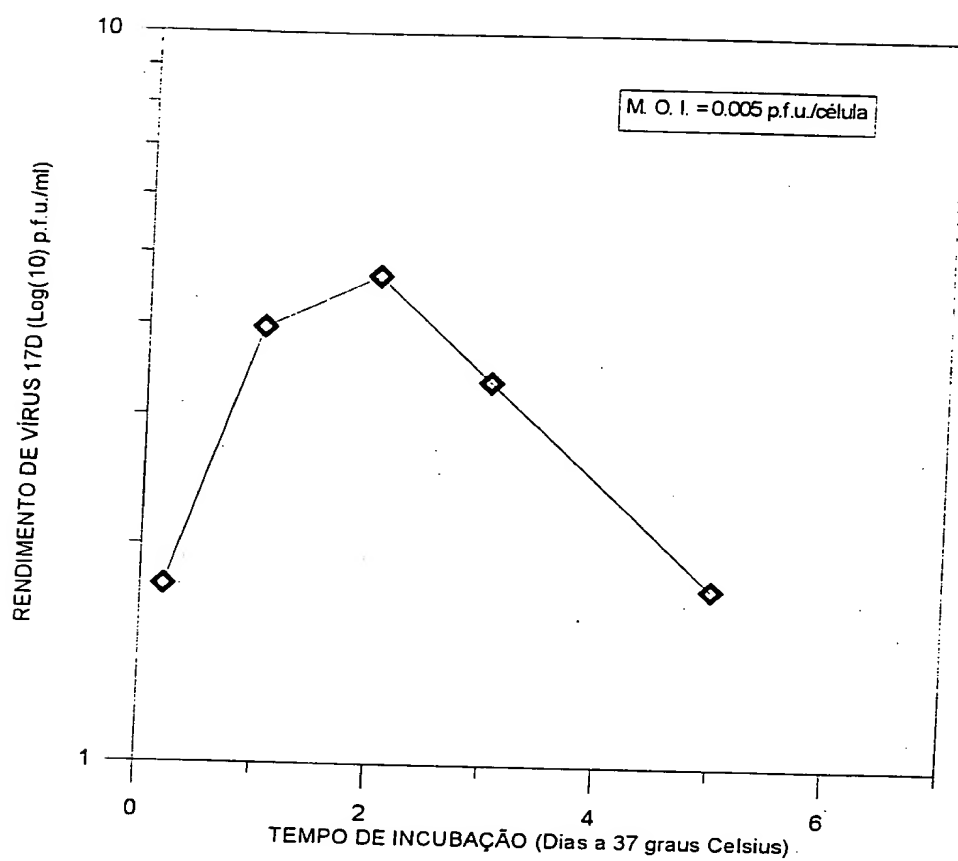


FIGURA 2 A

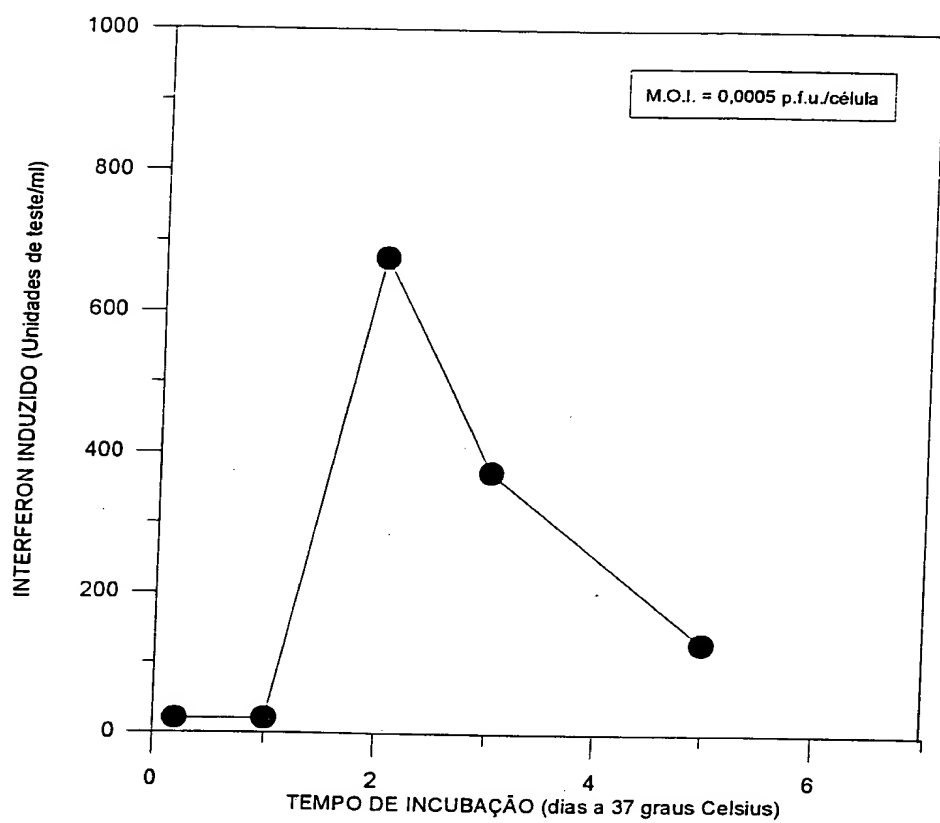


FIGURA 2 B

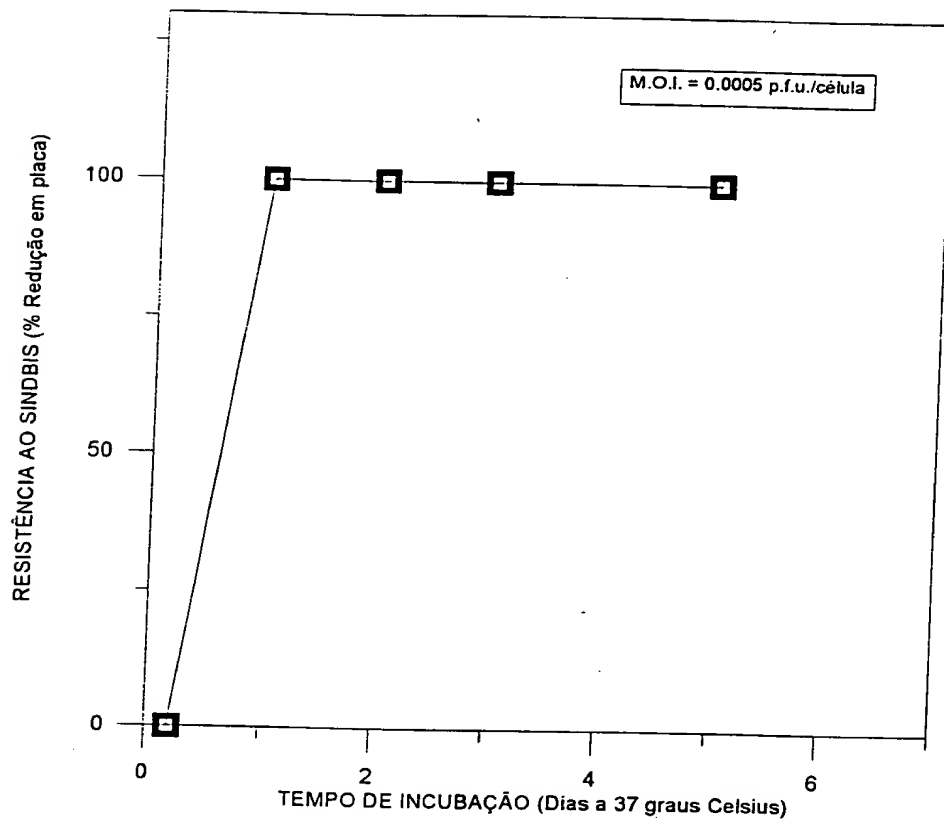


FIGURA 2 C

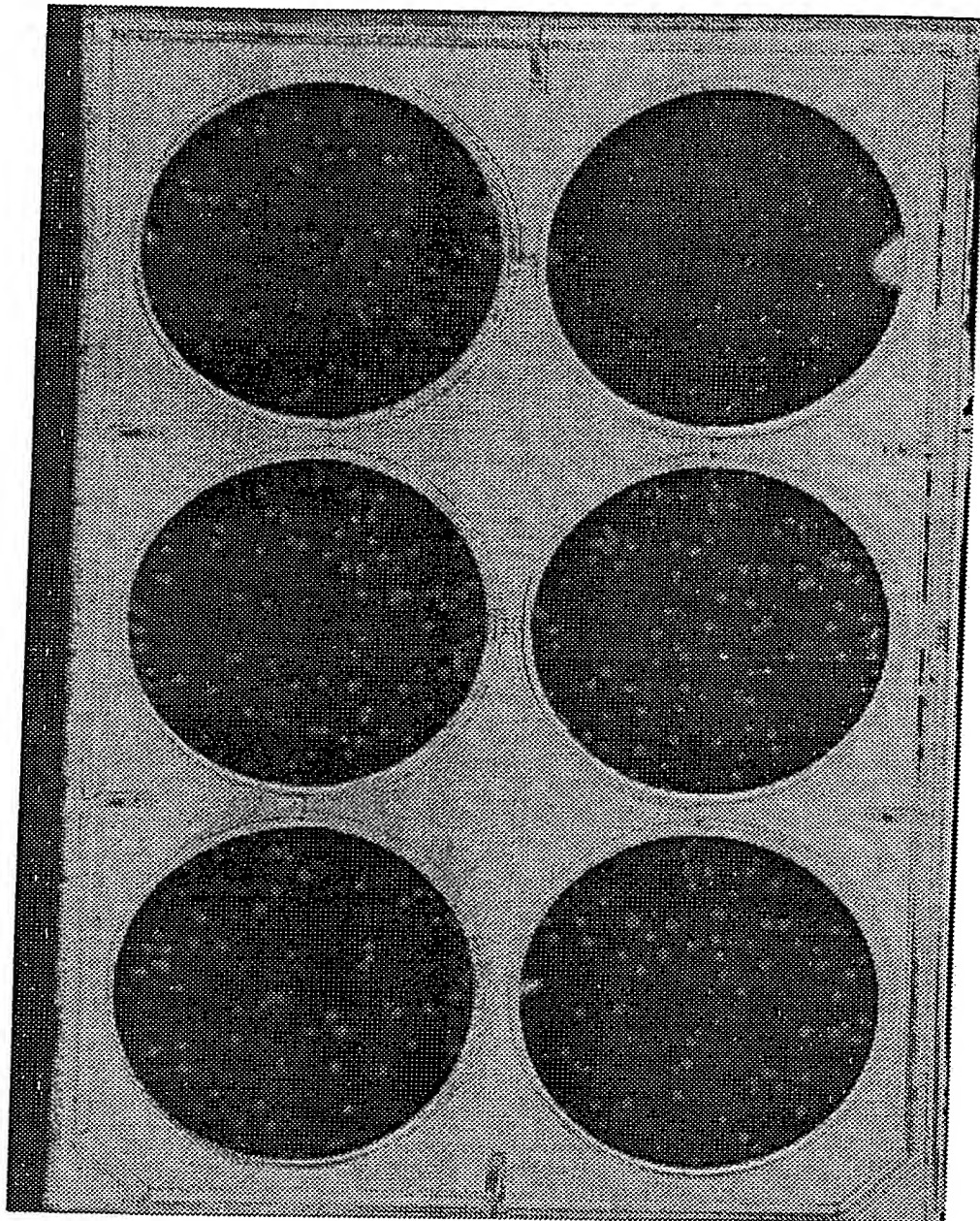


FIGURA 3A

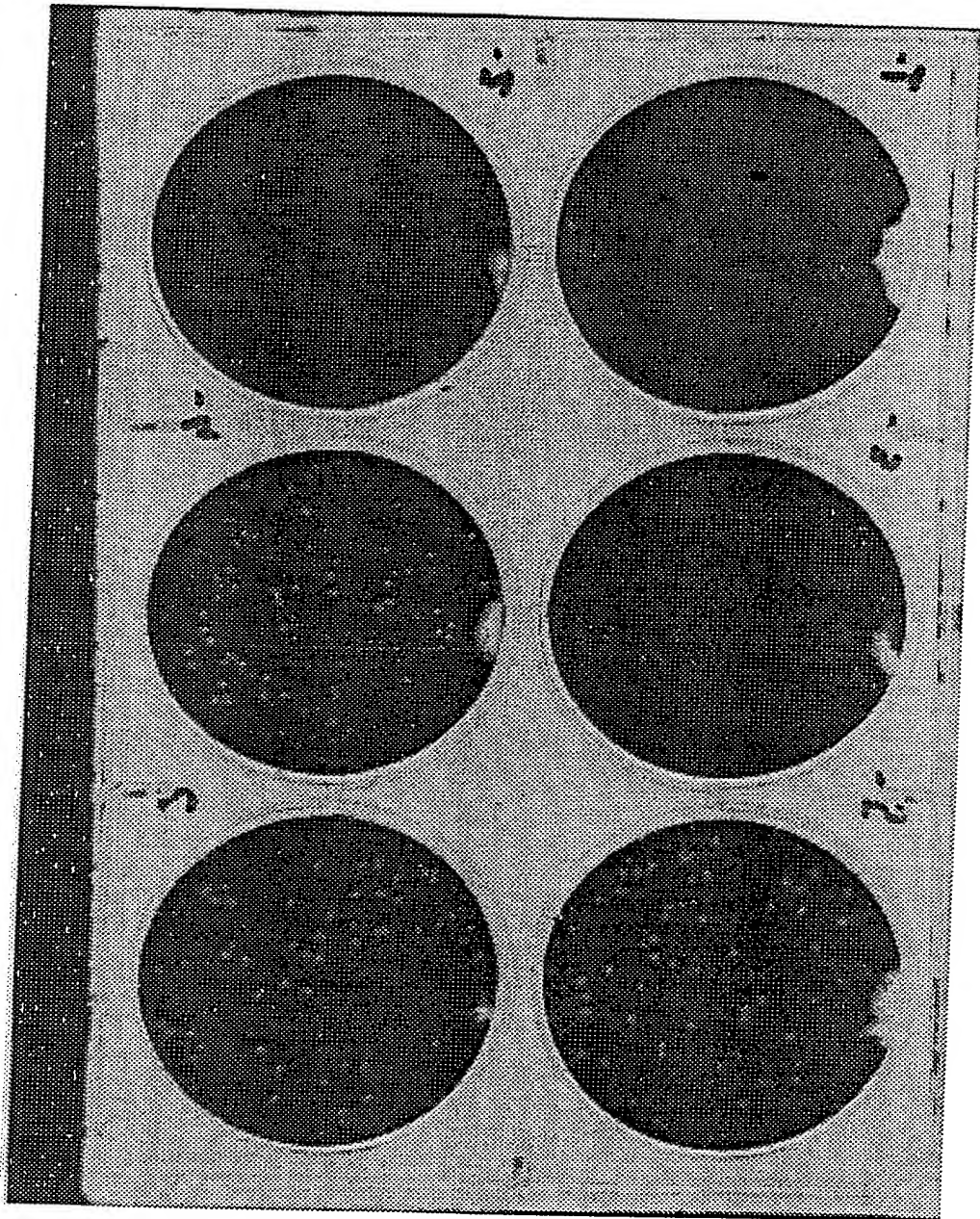


FIGURA 3B

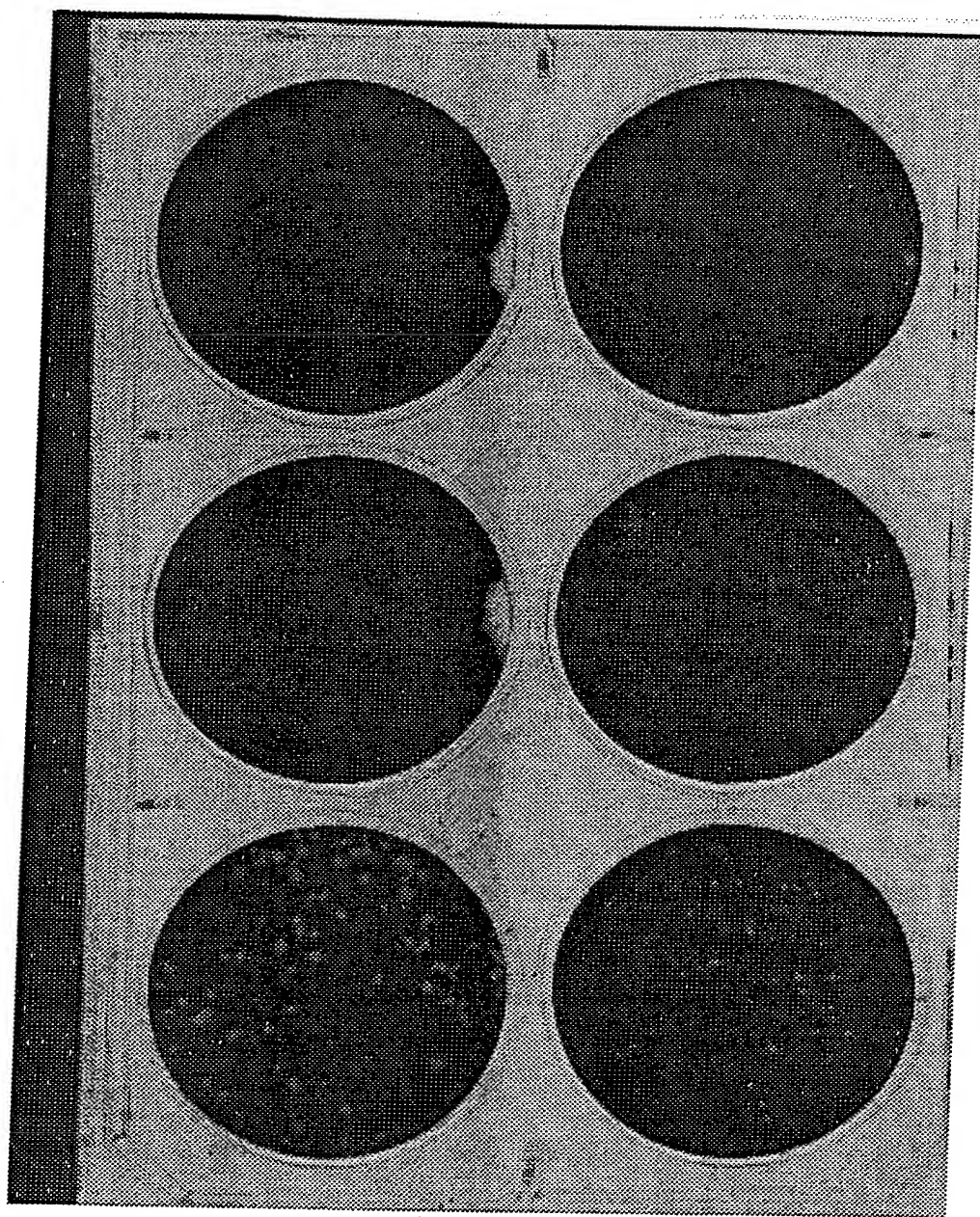


FIGURA 3C

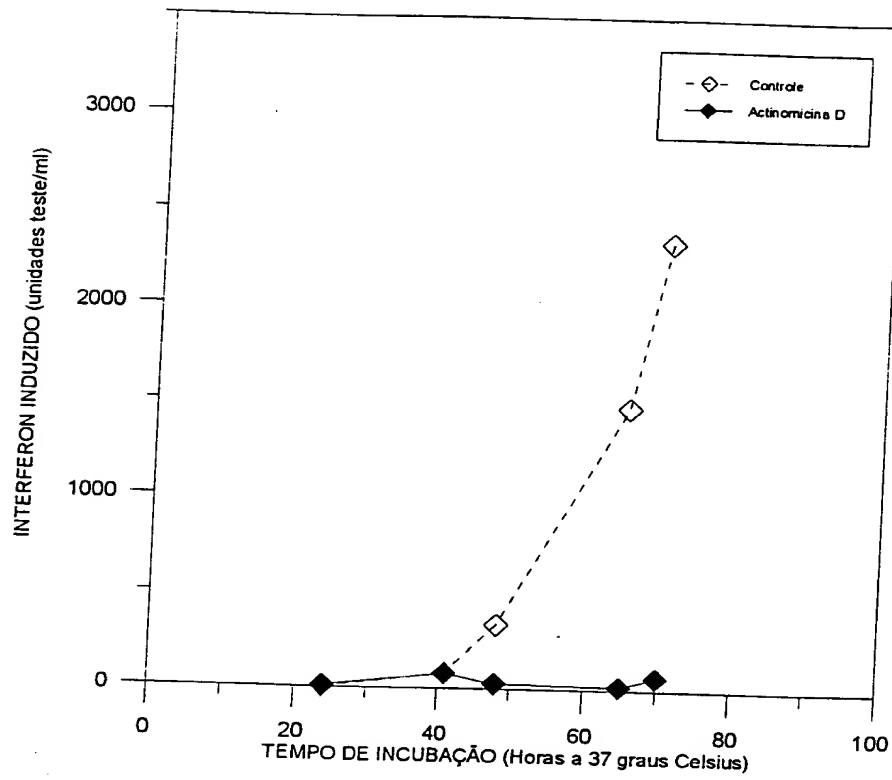


FIGURA 4 A

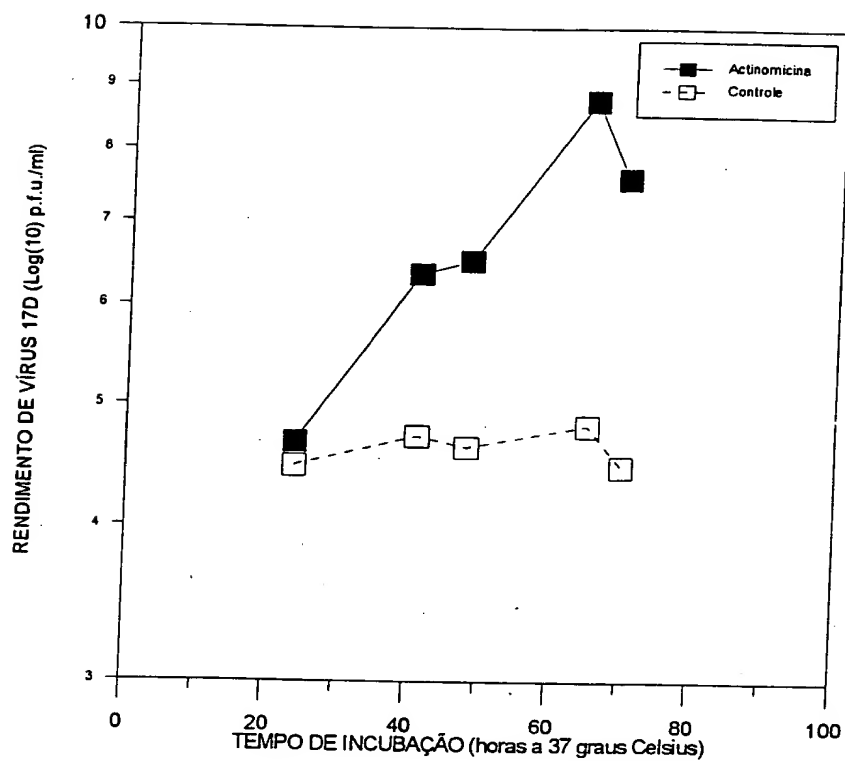


FIGURA 4B

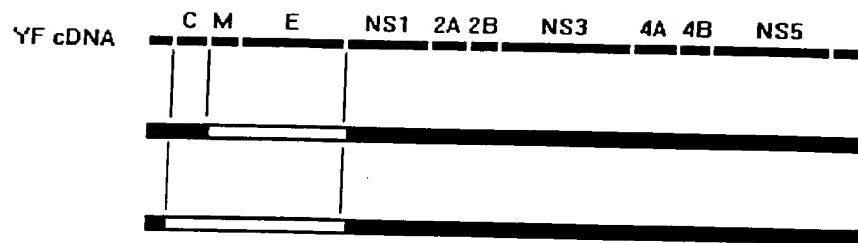


FIGURA 5

RESUMO

PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE VÍRUS EM CULTURA DE CÉLULAS
E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE VACINA CONTRA INFECÇÕES
CAUSADAS POR FLAVIVIRUS

5 A presente invenção refere-se a um processo para a produção de vírus em cultura de células com rendimento elevado e baixos níveis de contaminação por proteínas celulares, o vírus sendo apropriado para uso na preparação de lotes semente e vacinas. O vírus pode ser do tipo inativado, atenuado e vírus recombinante, incluindo vírus quimérico.

O processo para a produção de vírus em cultura de células compreende as etapas de: (a) preparação de uma cultura de células que são permissivas ao vírus e
15 aceitáveis como um substrato na produção de vacina; (b) suspensão das células em um meio apropriado seguida da semeadura de células a baixas densidades; (c) incubação da cultura de células a 30 até 40°C por um período de tempo apropriado; (d) remoção do meio da cultura de
20 células da etapa (c) e inoculação com vírus semente; (e) incubação da cultura de células da etapa (d) a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado; (f) remoção do meio seguido de lavagem das células uma ou mais vezes para reposição do meio; (g) incubação da cultura
25 de células obtidas na etapa (f) a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado; (h) coleta parcial ou completa do sobrenadante de cultura contendo o vírus,

com ou sem adição de estabilizador; (i) opcionalmente, realização de coletas múltiplas de meio contendo o vírus, a intervalos desejados, pela reposição do meio removido e re-incubação da cultura por um período de tempo apropriado; (j) opcionalmente, remoção dos restos celulares e das células integras do vírus coletado; (l) opcionalmente, inativação do vírus e; (m) armazenagem do vírus a -45°C ou temperaturas mais baixas.

O processo de produção de vacina de Flavivirus em cultura de células, compreende as etapas de: (a) preparação de uma cultura de células que são permissivas ao vírus e aceitáveis como um substrato na produção de vacina; (b) suspensão das células em um meio apropriado seguida da sementeira de células a baixas densidades; (c) incubação da cultura de células a 30 até 40°C por um período de tempo apropriado; (d) remoção do meio da cultura de células da etapa (c) e inoculação com vírus semente; (e) incubação da cultura de células da etapa (d) a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado; (f) remoção do meio seguido de lavagem das células uma ou mais vezes para reposição do meio; (g) incubação da cultura de células obtidas na etapa (f) a 25 até 40°C por um período de tempo apropriado; (h) coleta parcial ou completa do sobrenadante de cultura contendo o vírus, com ou sem adição de estabilizador; (i) opcionalmente, realização de coletas múltiplas de meio contendo o vírus, a

intervalos desejados, pela reposição do meio removido e re-incubação da cultura por um período de tempo apropriado; (j) opcionalmente, remoção dos restos celulares e das células íntegras do vírus coletado; (l) 5 opcionalmente, inativação do vírus e; (m) opcionalmente, liofilização da composição de vacina das etapas h, i, j ou l para obter a forma seca congelada da composição de vacina. Se for usado estabilizador, ele pode ser adicionado ao vírus colhido nas etapas em que haja troca de meio antes da estocagem a -45 até -196°C. O produto de vacina apropriadamente não contém níveis significativos de proteínas da célula hospedeira, por exemplo, proteínas de galinha (< 100 nanogramas/dose humana).

THIS PAGE BLANK (USPTO)